

·基础研究·

自体骨髓间充质干细胞心内膜移植治疗急性心肌梗死的安全性及疗效评价

程芮 王士雯 曹丰 张友荣 徐勇 孟玲 王韞芳 李艳华 彭享胜 裴雪涛

【摘要】 目的 探讨自体骨髓间充质干细胞(MSCs)体外扩增后经心内膜移植治疗急性心肌梗死的安全性及治疗效果。方法 开胸结扎再通形成小型猪急性心肌梗死再灌注损伤的动物模型,抽取骨髓,1.077 g/ml 密度梯度离心法分离骨髓单个核细胞,扩增培养后 2~3 周经导管心内膜移植,移植前后心功能及血生化检查,3 个月时取梗死心肌、肝、肾、脾等组织冰冻切片及 HE 染色,免疫荧光法鉴定结蛋白 desmin 和心肌特异性肌钙蛋白 I (cTnI) 的表达。结果 小型猪 MSCs 为形态均一的梭形细胞,每 40 ml 骨髓液经 2~3 周传 3 代平均获得 $(3.81 \pm 0.09) \times 10^7$ 个细胞,移植后 6 周及 3 个月 LVEF 较梗死后明显改善 ($P < 0.05$),肝肾功能、血糖、动脉血气结果正常,3 个月荧光显微镜下可见移植细胞,免疫组化提示 desmin 及 cTnI 表达阳性,HE 染色提示肝、脾、肾等主要脏器结构正常。结论 体外扩增 MSCs 体内移植安全,各重要脏器功能及结构正常,心内膜注射移植操作方便,移植后的 MSCs 体内定位明确,心功能改善,并有心肌相关蛋白的表达。

【关键词】 猪;骨髓间充质干细胞;心肌梗死;心内膜移植

Evaluation of the safety and effectiveness of autologous bone marrow mesenchymal stem cell transplantation into endocardium in treatment of acute myocardial infarction

CHENG Rui, WANG Shiwen, CAO Feng, et al

Institute of Geriatric Cardiology, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China

Institute of Blood Transfusion, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China

【Abstract】 Objective To evaluate the safety and effectiveness of autologous mesenchymal stem cell (MSCs) transplantation into endocardium in treatment of acute myocardial infarction. Methods Acute myocardial infarction was induced by reperfusion after ligating the left anterior descending coronary artery (LAD) for 1 hour in swines. Mononuclear cells (MNCs) were freshly isolated from the bone marrow blood by 1.077 g/ml density-gradient centrifugation. Two to three weeks after cultured in the complete cell-culturing medium, the purified MSCs or medium without serum were autologously transplanted into the target ischemic endocardium by injection catheter. The myocardium around infarcted region was examined under fluorescence microscope with immunohistochemistry for desmin and myocardium-specific troponin I (cTnI) 3 months after transplantation. LV function and blood biochemistry were examined at 6 weeks and 3 months after transplantation. Results The swine MSCs showed a fibroblast-like morphology with vortex-like distribution at their peak propagation and $(3.81 \pm 0.09) \times 10^7$ cells were harvested after culturing three generations over 2~3 weeks. DAPI-labeled MSCs in 1ml of medium and medium only were injected into many sites of the ischemic LAD territory with injection catheter. Left ventricular function was improved significantly and the LVEFs were $46.6 \pm 3.5\%$ and $56.7 \pm 0.8\%$ vs $34.9 \pm 0.9\%$ ($P < 0.05$) at 6 weeks and 3 months vs post-AMI respectively. The functions of liver and kidney, blood glucose and arterial blood gas analysis were normal. The blue fluorescent nuclear cells expressed markers of

收稿日期:2004-10-19

基金项目:国家 973 计划 (2001CB509906)、国家 863 计划重大专项(2002AA205051, 2003AA205160)国家自然科学基金(03050402)和北京市科委重大项目(H020220010190)。

作者单位:100853 北京市,解放军总医院老年心血管病研究所(程芮,王士雯,彭享胜);100850 北京市,军事医学科学院输血研究所干细胞生物学研究室(曹丰,张友荣,王韞芳,李艳华,裴雪涛);100853 北京市,解放军总医院心内科(徐勇);100853 北京市,解放军总医院南楼心肾科(孟玲)

作者简介:程芮,女,1966 年 10 月生,天津市人,医学博士,副主任医师。Tel:010-66936762

myocardium phenotype which showed positive stain of desmin and cTnI. The function and microstructure of important organs were normal. **Conclusions** The *in vitro* propagated MSCs were safe for regeneration therapy *in vivo*. The experimental endocardium injection catheter can be used in experimental study due to its convenient manipulation. The transplanted MSCs are located definitely and express markers of myocardium phenotype, resulting in the significant improvement of heart function.

【Key words】 swine; bone marrow mesenchymal stem cells; myocardial infarction; endocardium transplantation

研究证实胚胎干细胞、骨骼肌成肌细胞、骨髓造血干细胞亚群(SP细胞)、特别是骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)等心肌内移植后可以改善心肌梗死后心脏功能^[1-4]。但由于体内MSCs数量少,仅占骨髓单个核细胞的1/10万,用于细胞再生治疗时需要体外扩增到一定数量,而经体外处理的细胞移植到体内后对其它脏器功能影响,特别是远期安全性评价直接关系到临床应用前景。本研究采用改良的心内膜注射导管将体外扩增后自体MSCs心肌内移植,探讨了其安全性及治疗效果,为MSCs应用于临床提供实验依据。

1 材料及方法

1.1 材料 小型猪10只,4~6月龄,体重28~45 kg,雌雄不限,解放军总医院实验动物中心提供;Ficoll分离液(联星公司),Percoll分离液(联星公司);DMEM-F₁₂(Dulbecco's modified Eagle's medium-F₁₂)培养基(Hyclone);胎牛血清(Hyclone);4',6'-二乙酰基-2-苯基吲哚(DAPI),羊抗人心肌特异性肌钙蛋白I(cardiac-specific troponin I, cTnI)多克隆抗体(SantaCruz)、一抗为鼠抗猪desmin单克隆抗体(Sigma公司,150倍稀释),FITC标记的兔抗羊IgG(北京中山生物公司),TRITC标记的羊抗小鼠IgG(北京中山生物公司)。6FJR_{4.0}造影导管及8FJR_{4.0}指引导管(Cordis),27号皮试针头(天津哈娜好),190 cm×0.014英寸BMW/ACS导丝(UNIVERSAL),泛影普胺,SIEMENS-ELEMA900B(SWEDEN)呼吸机,GE CardioServ除颤仪,GenHeart EPS电生理记录仪,MAXIMUS-CM80 PHILIPS血管造影机等。

1.2 骨髓间充质干细胞的分离、纯化及扩增培养 小型猪戊巴比妥钠25 mg/kg肌注+静脉注射复合麻醉,开胸术前无菌条件下髂后上棘穿刺,双侧多点抽取骨髓液40 ml,加入等量DMEM-F₁₂培养液稀释,200目滤网过滤后置于50 ml离心管中,室温2500 rpm离心5 min,弃上清及脂肪层,用DMEM-F₁₂培养液重悬细胞,制成单细胞悬液,将骨髓液分别轻轻叠加到密度1.077 g/ml的Ficoll分离液上,室温

1500 rpm离心30 min,吸取白细胞膜层以上的部分,离心洗涤,加入完全培养基(DMEM-F₁₂+10%胎牛血清+双抗含100 U/ml青霉素及100 mg/ml链霉素)中充分混匀,并将分离的细胞按(2~3)×10⁵/cm²的浓度接种于25 ml塑料培养瓶中,置于37℃,5%CO₂和饱和湿度的孵箱中进行培养,72 h后更换培养液,弃掉未贴壁细胞,以后每2~3 d换液一次。细胞长到80%融合时用0.25%的胰蛋白酶+0.02% EDTA消化并按照8×10⁵/cm²的密度接种1:2比例传代。2~3周后于移植当天用0.25%的胰蛋白酶+0.02% EDTA消化、计数、DAPI标记4℃冰浴中备用。

1.3 建立急性心肌梗死动物模型 动物麻醉后,耳静脉建立静脉通路,气管插管,呼吸机辅助通气,通气量7~9 L,心电监测,有创血压监测,左侧第5肋间逐层开胸,切开心包,作心包吊床,分离第一对角支与第二对角支间左前降支,用4.0 Prolene缝线将24号套管针(截去针尖)与前降支共同结扎,约60 min后抽出套管针使血管重新开放,截取BMW/ACS导丝头端(不透X线)部分约20 cm缝在梗死部位的心外膜上,作为心内膜移植时的标记,自主呼吸恢复后脱机,关胸,超声心动图检查,手术前后抽血动脉血气分析、cTnI及生化的检查,青霉素320万单位肌注3 d,1次/d。

1.4 心内膜细胞移植 注射导管制作方法将27号皮试针头(截短,留取针头长度为5~6 mm,塑料乳头部分削成直径约2 mm粗细),粘到6FJR_{4.0}造影导管头端,8FJR_{4.0}指引导管尾端截短,并用7 F鞘管外套重新粘接,将注射导管套入指引导管内,尾端长出约2.5 cm,保证导管及针头通畅。急性心肌梗死再灌注损伤2~3周,建立右颈动脉通路,造影显示左冠状动脉走行,将注射导管送至左心室,导管尖端与心内膜接触后心电监测出现频发室性早搏,抽取DAPI标记好的单细胞悬液1 ml,透视下沿环形导丝周围多点注射,对照组注射等量无血清培养基。

1.5 心功能及主要脏器功能评价 心肌梗死前后、移植后6周及3个月处死前超声心动图测量左室射血分数(left ventricular ejection fraction, LVEF),同时

抽血行肝肾功能、血糖、心肌酶、动脉血气分析等项检查。

1.6 病理检查及免疫组化染色 细胞移植后3个月处死动物,取心肌梗死边缘区心肌组织、肝、肾、脾等重要脏器做连续冰冻切片,厚度6~10 μm,观察细胞在心脏定位及组织截留,免疫荧光双标法检测 desmin、心肌特异性 cTnI 的表达,同时进行 HE 染色观察结构变化。取有阳性细胞的冰冻切片进行免疫组化染色,方法:丙酮:甲醇(1:1)室温固定 10 min, 1×PBS清洗 3 次,每次 5 min,于 5% 正常马血清的 PBS 液中 37℃ 孵育 15 min,弃去马血清,加入 I 抗,放置 4℃ 过夜,1×PBS 清洗 3 次,每次 5 min,加入 II 抗,37℃ 避光湿盒内孵育 30 min,1×PBS 冲洗后在荧光显微镜下观察 desmin、cTn I 的表达。

1.7 结果判定及统计学处理 阳性反应细胞为红色、绿色荧光,细胞核为蓝色。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,SPSS10.0 统计软件分析,组间比较采用成组 *t* 检验法,*P* < 0.05 为有显著性差异。

2 结果

2.1 骨髓间充质干细胞的培养 40 ml 骨髓液,按照 2~3×10⁵ 密度 25 ml 培养瓶可以接种 2~3 瓶,接种 24 h 即有少量细胞贴壁生长,呈细小梭形,72 h 出现小克隆,7 d 后出现较大的克隆,10 d 左右细胞集落扩大,为形态均一的梭形细胞,达 80%~90% 融合时消化传代,传代细胞生长旺盛时呈漩涡样,平均每 3 d 左右细胞达 70%~80% 融合,每瓶平均获得(6.2±0.11)×10⁵ 个 MSCs,按照 1:2~1:3 比例及时传代,扩增 3 代后可获得(3.81±0.09)×10⁷ 个细

胞,达到移植数量,DAPI 标记,标记率为 100% (图 1 A、B、C)。

2.2 心内膜移植 注射导管残留液体约 0.5 ml,移植细胞消化标记后重悬于 1 ml 无血清培养基中,按照每点移植细胞悬液 100 μl,共进行 11 点心内膜注射,有效移植 10.04±0.02 点,对照组为 9.03±0.14 点。

2.3 cTnI、生化、动脉血气及 LVEF 结果 (表 1)

心梗后 cTnI 及心肌酶明显增高 *P* < 0.001,移植后 3 个月时虽较心梗后降低,但仍高于基础值;撤除呼吸机 1~2 h 后(术后行超声心动图检查)动脉血气提示血氧分压降低,轻度二氧化碳潴留,呼吸性酸中毒,6 周及 3 个月时血气分析恢复正常,未出现气体交换异常;肝肾功能心梗前后、移植后 6 周及 3 个月未见明显改变。

移植前 LVEF 为 69.3%±2.5% (*n* = 10),心梗后降低为 34.9%±0.9% (*n* = 10),移植后 6 周及 3 个月 LVEF 虽低于正常值但较心梗后明显改善,分别为 46.6%±3.5% (*n* = 5, *P* < 0.05)、56.7%±0.8% (*n* = 5, *P* < 0.05),而对照组 (*n* = 5) 无改善。两组心电图随访均未出现心律失常。

2.4 免疫荧光及病理结果 移植的 MSCs 荧光显微镜下细胞核为蓝色,免疫组化示 desmin (红色荧光) 及 cTnI (绿色荧光) 的表达均为阳性, (图 2 A、B、C); 阴性对照组各种抗体染色均未见阳性结果。肝脏、脾脏、双肾 HE 染色结构正常 (图 3 A、B、C)。

3 讨论

再生医学用于缺血性心脏病临床治疗有几个关

表 1 cTnI、生化、动脉血气变化

| 指标 | 心梗前 <i>n</i> = 10 | 心梗后 <i>n</i> = 10 | 移植后 (<i>n</i> = 5) | |
|--------------------------|----------------------|----------------------|---------------------|---------------|
| | | | 6 周 | 3 个月 |
| CTnI (ng/dl) | 0.31±0.07 | 5.56±0.54** | 0.93±0.02** | 1.02±0.45** |
| CK (U/L) | 89.52±7.34 | 1628.4±85.4** | 230.5±8.4*** | 190.5±5.5*** |
| LDH (U/L) | 180.5±11.3 | 651.5±30.9** | 319.4±13.2*** | 339.2±17.5*** |
| ALT/GPT (U/L) | 18.8±0.5 | 36.2±2.1 | 29.3±1.7 | 26.7±9.2 |
| AST/GOT (U/L) | 24.5±2.1 | 112.2±1.8* | 20.4±3.2# | 49.4±5.8** |
| BUN (mmol/L) | 4.46±0.7 | 4.4±0.5 | 2.3±0.4 | 6.57±1.1 |
| Cr (μmol/L) | 59.8±3.2 | 40.1±2.5 | 52.2±5.6 | 55.9±4.5 |
| GLU (mmol/L) | 4.49±0.9 | 5.1±1.3 | 6.8±0.7 | 9.27±0.8 |
| PaO ₂ (mmHg) | 98.9±0.7 | 83.2±3.6* | 90.2±3.4# | 92.3±2.1# |
| PaCO ₂ (mmHg) | 38.9±0.5 | 56.8±1.2* | 37.4±4.7# | 38.4±1.6# |
| pH | 7.39±0.8 | 7.32±1.1 | 7.42±0.6 | 7.38±0.6 |

注:与心梗前比较,* *P* < 0.05,** *P* < 0.01;与心梗后比较,# *P* < 0.05,*** *P* < 0.01

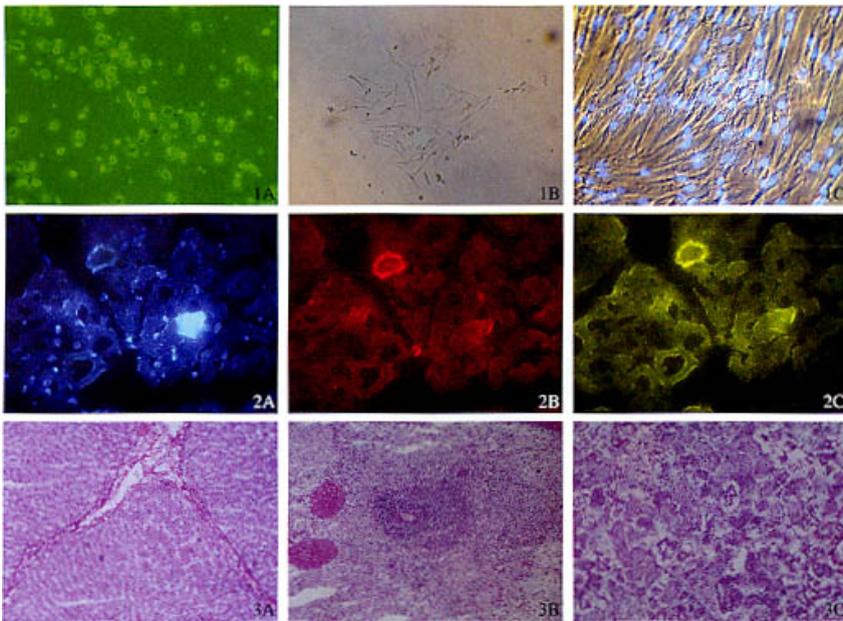


图1 MSCs 的分离、扩增培养及 DAPI 标记

1A 原代培养 24 h 的 MSCs 贴壁生长呈成纤维样梭形细胞(相差显微镜, × 200)

1B 原代培养 72 h 的 MSCs 形成小克隆(× 100)

1C 培养 10d 的 MSCs 呈形态均一的长梭形细胞生长 旺盛时呈漩涡状 DAPI 标记率为 100%(相差显微镜, × 200)

图2 细胞移植后免疫荧光结果

2A 免疫荧光检测到 DAPI 标记为蓝色的移植 MSCs(× 200); 2B desmin 表达阳性(× 200); 2C cTnI 表达阳性(× 200)

图3 移植后 3 个月重要脏器病理

3A 肝脏; 3B 脾脏; 3C 肾脏 HE 染色

键问题:种子细胞的选择、骨髓液需求量及细胞扩增周期、种子细胞体外扩增后回输的安全性、移植时间窗、何种移植途径才能最大地减少细胞的丢失和破坏、移植细胞归巢及功能的发挥。大量的研究表明,骨髓干细胞移植能够治疗心肌梗死,改善急性心肌梗死近期心脏功能及缺血性心脏病发生的远期结果^[5,6],来自 MSCs,是骨髓中的一种类似成纤维细胞的一类细胞,具有多方向分化潜能,可以向骨组织、软骨组织、皮肤、造血干细胞支持介质、骨骼肌及心肌细胞转化,自体 MSCs 移植克服了伦理及免疫排斥等问题,是目前公认的心肌细胞再生治疗理想的种子细胞。当机体发生急性心肌梗死后,这些早期干细胞和间质细胞能感应并自动迁移至梗死区心肌组织内,分化生成新的心肌、血管内皮及平滑肌细胞,但新形成的心肌细胞数量极少,再生仅仅局限于

存活部分的心肌^[8],不能有效地修复坏死的心肌组织,而且 MSCs 在体内仅占骨髓单个核细胞的 1/10 万,因此,选择 MSCs 作为移植细胞必须经过体外扩增,文献报道用于移植的细胞根据动物的大小一般需达到 $10^5 \sim 10^7$ 个,2~3 代,经过多次传代的细胞会造成表面标志物的丢失,另外,研究表明细胞移植应该在心肌梗死后的 1~2 周内,此时局部炎症反应减弱,心肌梗死后局部释放的趋化因子有利于移植细胞向梗死部位的迁移和存活^[9]。本研究表明小型猪骨髓液,外周血混合较少时,40 ml 左右经密度为 1.077 g/ml Ficoll 人淋巴细胞分离液分离单个核细胞,体外培养 2 周左右可扩增致 $10^6 \sim 10^7$ 的数量级,抽取适量的骨髓液不仅可以达到治疗对细胞数量的要求,实际应用时可以提高临床病人依从性,减少痛苦和不必要的损伤,对临床有重要的实用价值。对

于时间窗的选择,由于小型猪 MSCs 体外扩增速度较慢,1周左右细胞数量 $< 10^6$,本研究选择2~3周作为移植的时间窗,经心内膜移植后3个月随访证实梗死周边区有移植细胞定位、存活及增殖,移植细胞可以表达 desmin 及 cTnI 两种心肌特异性抗体,但由于本实验是结扎冠脉造成心梗后再通的动物模型,心功能改善与血管再通有很大关系,不能完全用移植细胞解释,移植细胞与宿主心肌整合及功能的发挥有待深入研究;临床急性心肌梗死血流动力学稳定的患者由于冠状动脉斑块的不稳定性除急诊介入治疗外一般选择2周左右行经皮冠状动脉介入(percutaneous coronary intervention, PCI),因此,根据本实验结果如临床有行细胞移植治疗的适应证,可以选择住院同时抽取患者骨髓,以便2周后PCI同时给予细胞移植治疗。

另外,国外通常采用 NOGA 操作系统在心内膜标测同时用特殊的注射导管进行心肌内细胞移植^[5,6,10],但该系统造价昂贵,目前国内临床较少应用,用于实验研究越发受到限制,本研究采用自制的注射导管,经实验证实制作简单、操作方便安全,对进一步不同种类、基因修饰等处理后的细胞,经心内膜途径移植的实验研究有一定的应用前景和使用价值。

扩增后的 MSCs 移植3个月时治疗组心肌酶仍高于正常值,但较梗死后及6周明显降低,两组心电图随访均未出现心律失常,动物精神状态正常,未见躁动、抑郁或肢体活动障碍,荧光显微镜下虽见有肺脏截流,但动脉血气分析正常,肝肾功能正常,HE染色肝、脾、肾未见病理改变。证实经 DMEM-F₁₂ 和胎牛血清体外培养的 MSCs 体内移植是安全的。心内膜移植理论上可以减少肺及脾截留,易于移植细胞定位,但此方法用于临床理想的情况是购置特殊设备,不如经冠脉、心外膜或静脉途径易于推广,改造的导管能否用于病人需要进一步论证,而且心内膜移植途径是否明显优于其他方法尚待深入研究。

参考文献

- 1 Scorsin M, Hagege A, Vilquin JT, et al. Comparison of the effects of fetal cardiomyocyte and skeletal myoblast transplantation on postinfarction left ventricular function. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2000, 119: 1169-1175.
- 2 Yau TM, Tomita S, Weisel RD, et al. Beneficial effect of autologous cell transplantation on infarcted heart function: comparison between bone marrow stromal cells and heart cells. *Ann Thorac Surg*, 2003, 75: 169-176.
- 3 Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature*, 2001, 410: 701-705.
- 4 Min JY, Yang Y, Converso KL, et al. Transplantation of embryonic stem cells improves cardiac function in postinfarcted rats. *J Appl Physiol*, 2002, 92: 288-296.
- 5 Atsuhiko K, Tengis T, Jun-Ichi Y, et al. Intramyocardial transplantation of autologous endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization of myocardial ischemia. *Circulation*, 2003, 107: 461-468.
- 6 Emerson CP, Hans FR, Radovan B, et al. Transendocardial, autologous bone marrow cell transplantation for severe, chronic ischemic heart failure. *Circulation*, 2003, 107: 2294-2302.
- 7 Kamihata H, Matsubara H, Nishiue T, et al. Implantation of bone marrow mononuclear cells into ischemic myocardium enhances collateral perfusion and regional function via side supply of angioblasts, angiogenic ligands, and cytokines. *Circulation*, 2001, 104: 1046-1052.
- 8 Beltrami AP, Urbaneck K, Kajstura J, et al. Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction. *N Engl J Med*, 2001, 344: 1750-1757.
- 9 Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, et al. Transplanted adult bone marrow cells repair myocardial infarcts in mice. *Ann NY Acad Sci*, 2001, 938: 221-229.
- 10 Fuchs S, Satler LF, Kornowski R, et al. Catheter-based autologous bone marrow myocardial injection in no-option patients with advanced coronary artery disease: a feasibility study. *J Am Coll Cardiol*, 2003, 41: 1721-1724.